

PROCEDIMIENTO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS CONTROLADA POR DERIVADOS SALICÍLICOS EN MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ORGANISMOS SUPERIORES.

5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se engloba dentro del campo de la ingeniería genética. Más concretamente, la presente invención se relaciona con la manipulación de la expresión génica en bacterias cuando estas están asociadas a células de organismos superiores, empleando compuestos químicos como inductores de dicha expresión de genes heterólogos.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Para las aplicaciones biotecnológicas *in situ* de organismos recombinantes vivos, la expresión génica en los microorganismos ha de estar fuertemente regulada con el fin de evitar un gran desgaste metabólico innecesario (Glick BR. 20 Biotechnol Adv. 1995, 13:247-61) El ambiente y la flora intestinal pueden llegar a ejercer una fuerte presión selectiva en contra de las cepas que expresen constitutivamente genes heterólogos. Incluso en cultivos puros, los mutantes de baja expresión son capaces de 25 dominar el cultivo en tan solo unas pocas docenas de generaciones. La expresión de los genes heterólogos debe permanecer silenciada hasta que se desee su activación. La señal inductora debe ser específica especialmente en ambientes complejos, con el fin de evitar la sobre- 30 expresión en vano de los genes de interés. Se pueden usar dos alternativas para diseñar un correcto control de los genes heterólogos: i) Promotores regulados por condiciones ambientales, donde la señal ambiental coincide con el lugar de acción. ii) Promotores inducibles químicamente donde el 35 compuesto es añadido en el momento y lugar donde se requiera la actividad. Esta última opción es la elegida preferentemente. Por ejemplo, uno puede manipular un

fenotipo de un organismo dado a través de la adición de un compuesto químico y así controlar de forma tanto positiva como negativa la aparición de dicho fenotipo.

5 Para aplicaciones biotecnológicas, un inductor químico ideal requiere una serie de características: 1) el inductor debe ser lo suficientemente barato como para ser usado en altas cantidades. 2) Debe ser compatible con el medio ambiente y/o biodegradable. 3) El inductor debe ser capaz 10 de atravesar las diversas membranas celulares si la inducción debe tener lugar en bacterias endocitadas, o en general, bacterias hospedadas por un organismo superior. 4) Para bacterias hospedadas en organismos superiores, los posibles efectos farmacológicos sobre el sistema deben ser 15 minimizados, o deben tener efectos toxicológicos relativamente bajos.

Los sistemas regulatorios predominantes capaces de controlar efectivamente la expresión génica por inductores 20 químicos son los sistemas *lacI/lac*, tanto en células procariontes como en eucariontes (Gossen M y cols., Trends Biochem Sci. 1993, 18:471-5). Estos sistemas basados en el operón de la lactosa tienen inductores fisiológicos que pueden ser rápidamente metabolizados, como por ejemplo 25 lactosa, o no catabolizables como por ejemplo IPTG, del que se sospecha puede producir efectos toxicológicos en células de mamífero.

La tetraciclina, al igual que otros antibióticos, ha 30 sido utilizada como un inductor químico efectivo tanto en células procariontes como eucariontes. Este sistema consiste en promotores fuertes que son reprimidos por el regulador sensible a tetraciclina TetR. Uno de los mayores problemas que se plantean es el uso de moléculas 35 antibióticas para la inducción.

En Cebolla y cols. (Appl. Environ. Microbiol. 2002,

68: 5034-41 y J. Biol. Chem. 1997, 272: 3986-92) se describieron sistemas regulatorios de compuestos xenobióticos capaces de ser activados por diversos derivados de salicilato, incluyendo uno de los mejor 5 conocidos fármacos del mercado, ácido acetilsalicílico (ASA). ASA es un inductor que cumpliría con todos los requerimientos para ser un inductor químico ideal para el control químico *in situ* de la expresión génica heteróloga.

10 Los factores que controlan la ruta de degradación del naftaleno, la proteína NahR y sus promotores diana *Psal* y *Pnah*, han sido utilizados para expresar diversos genes heterólogos en distintas estirpes bacterianas, incluyendo *E. coli* (Cebolla A y cols., Nucleic Acids Res. 2001, 15 29:759-66), *Bordetella* (Suarez A y cols., Appl Environ Microbiol. 1997, 63:122-7.) y *Pseudomonas* (Cebolla A y cols., Nucleic Acids Res. 2001, 29:759-66). El sistema regulador *nahR/Psal* se ha usado también como biosensor, al ser fusionado al operón *lux* de *Vibrio fischeri* (Burlage RS 20 y cols., J Bacteriol. 1990, 172:4749-57), y ha sido de igual forma usado como sistema de producción de proteínas recombinantes (de Lorenzo V y cols., Gene. 1993, 130:41-6). Se ha demostrado que el sistema *nahR/Psal* está finamente regulado, mostrando una capacidad de inducción de entre 20 25 y 100 veces en respuesta a su inductor natural, el salicilato (Cebolla A y cols., J Biol Chem. 1997, 272:3986-92). Existen vectores para establecer el sistema regulador de *nahR/Psal* en el cromosoma de bacterias gram negativas mediante el uso de minitrasposones. Igualmente se ha usado 30 para expresar la proteína de membrana externa LamB en la superficie de *E. coli* y *Pseudomonas putida* (de Lorenzo V y cols., Gene. 1993, 130:41-6; Cebolla A y cols., Appl Environ Microbiol. 1996, 62:214-20). Están disponibles 35 también otros sistemas de regulación inducibles por compuestos aromáticos, que pueden ser a su vez activados por el ácido acetil salicílico. Es el caso de *XylS2*, una variación mutante del regulador *XylS* que reconoce y

controla la expresión del operón meta en la ruta catabólica del tolueno/xileno en *Pseudomonas putida*. Ésta variante es capaz de reconocer el ácido acetil salicílico e inducir la expresión unas 10 veces. La capacidad de regulación del sistema de expresión *nahR/Psal* se puede a su vez aumentar de 7 a 20 veces (llegando por tanto a una inducción de 1000 veces) usando un sistema de regulación en cascada donde se coloque el reguladores *xylS2/Pm* aguas debajo de *nahR/Psal*, puesto que ambos se activan simultáneamente por salicilato y/o el ácido acetil salicílico (patente US2001016354).

Otros sistemas reguladores que responden a salicilato son los sistemas derivados del represor MarR, y sus promotores diana (Martin RG y Rosner JL, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92:5456-60; Sulavik MC y cols., Mol Med. 1995, 1:436-46). Estos promotores se inducen en presencia de salicilato porque este inhibe la unión al operador. MarR purificado exhibe una K_d de 0,5 mM hacia el salicilato (Martin RG y Rosner JL, Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92:5456-60). Los elementos reguladores de repuesta a salicilato se han descrito ya en células eucarióticas, especialmente en plantas donde el salicilato es la molécula principal en el desencadenamiento de señales que promuevan la resistencia sistémica adquirida. En plantas se han descrito al menos 5 factores pueden interaccionar con el salicilato, incluyendo quinasas, proteínas de unión a salicilato, etc. (Reymond P y cols., Curr Opin Plant Biol. 1998, 1:404-11). Parece ser que derivados del salicilato, y particularmente el ácido acetil salicílico, pueden usarse como inductores de la señal usando una gran variedad de factores disponibles o bien modificaciones artificiales del mismo (Ramos JL y cols., Proc Natl Acad Sci U S A. 1986, 83:8467-71., Cebolla A y cols., J Biol Chem. 1997, 272:3986-92).

35

Diversos sistemas reguladores han sido utilizados como sistemas de expresión para la producción de proteínas

recombinantes inducidos por salicilatos o derivados, como por ejemplo el sistema regulatorio nahR/Psal, otros reguladores de la familia lysR nahR, derivados del represor MarR y sus promotores diana, o el sistema xylS2/Pm o 5 derivados de la familia de reguladores xylS/araC

El problema a resolver por la presente invención, es el proporcionar un método para controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos que están asociados a 10 células de organismos superiores, usando un compuesto relativamente bien tolerado.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención describe un método para el control de la expresión de genes heterólogos en microorganismos que están asociados a células de organismos superiores, incluyendo humanos.

20 De modo que la presente invención, proporciona el uso de secuencias de ADN que codifiquen reguladores que respondan a salicilato, con el objetivo de controlar la expresión heteróloga de genes en microbios cuando desarrollen algún tipo de asociación con un organismo 25 superior. Los compuestos químicos que activan el sistema pueden ser transportados activa o pasivamente a través de las membranas biológicas y así activar las cepas manipuladas genéticamente incluso cuando se encuentran en el interior del organismo superior. El sistema de control 30 génico aquí descrito está muy bien regulado mediante un compuesto químico, de forma que se reduce el gasto metabólico ya que la acción del gen heterólogo es nula cuando no se ha añadido inductor. Los compuestos químicos usados en la invención como inductores son tanto el 35 salicilato como las moléculas derivadas de él, tales como el ácido acetil salicílico o el benzoato. Estos compuestos se han probado para uso en humanos y tienen una nivel de

toxicidad bajo para aplicaciones terapéuticas, y tienen parámetros farmacocinéticos y farmacotoxicológicos bien definidos.

5 El sistema regulador se puede introducir en un microorganismo por medio de plásmidos, o preferentemente mediante el uso de vectores integrativos para asegurar la estabilidad del genotipo (por ejemplo, Cebolla A y cols., Appl Environ Microbiol. 2002, 68:5034-41).

10

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, dicho método comprende un sistema regulador que puede ser controlado por un inductor químico, un microorganismo huésped que contiene el sistema regulador capaz de 15 interaccionar o asociarse con células de organismos superiores y uno o varios compuestos químicos que actúa como inductor, el cual es salicilato o un derivado de salicilato, el cual puede transportarse a través del organismo superior asociado y activar o reprimir la 20 expresión de genes heterólogos en el microorganismo huésped modificado.

De acuerdo con otro aspecto más preferido de la 25 presente invención, el compuesto químico inductor empleado es salicilato, antranilato, 2-acetil salicilato, 4-cloro-salicilato, 5-cloro-salicilato, 3,5-dicloro-salicilato, 5-metoxi-salicilato, benzoato, 3-metil-benzoato, 2-metoxi-benzoato, 3-methyl-salicilato, 4-metil-salicilato, o 5-metil -salicilato o cualquier otro derivado del salicilato 30 que mantenga el grupo C-1 carboxílico en el anillo aromático o mezcla de estos.

Las células bacterianas mantendrían su viabilidad y 35 estado físico al tener silenciado la expresión de los genes heterólogos. La administración del fármaco permitiría su inducción cuando se quisiera activar la expresión de los genes heterólogos por ella presentados incluso en células

infectadas.

Según otro aspecto de la presente invención, el sistema regulador comprende al menos una proteína 5 reguladora que pertenece a la familia de reguladores LysR/NahR.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el sistema regulador comprende al menos una proteína 10 reguladora que pertenece a la familia de reguladores AraC/XylS.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el sistema regulador comprende al menos una proteína 15 reguladora que pertenece a la familia de reguladores MarR.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el sistema regulador comprende la familia de sistemas reguladores *nahR/Psal* o mutantes de estos mismos elementos.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, el sistema regulador comprende la familia de sistemas reguladores *xylS/Pm* o mutantes de estos mismos.

25 Según otro aspecto de la presente invención, el sistema regulador comprende un circuito genético en cascada que comprende el regulador transcripcional NahR o una forma mutante de este y el regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este, donde los reguladores 30 transcripcionales están puestos en un orden jerárquico tal que el regulador transcripcional NahR o una forma mutante de este estimule la expresión del regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este y donde el regulador transcripcional NahR o una forma mutante de este y el 35 regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este responden al mismo inductor, que en este caso se trata de salicilato o derivados, y un promotor diana terminal el

cual es sensible de una forma dosis-dependiente al regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este.

Según una forma preferida de realización de la 5 presente invención, el microorganismo capaz de interaccionar o asociarse con células de organismos superiores es un procarionte.

Según una forma aún más preferida de realización de la 10 presente invención, se emplea células bacterianas Gram-negativas.

De acuerdo con otra forma de realización más preferida, el sistema genético se emplea en bacterias 15 patógenas atenuadas, como por ejemplo en bacterias del género *Salmonella*, pudiendo inducirse una vez hospedada por la célula eucariótica por concentraciones del compuesto químico inductor dentro del rango de seguridad farmacológica.

20 De manera más específica, el método de la presente invención permite controlar la expresión de proteínas terapéuticas o proteínas de diagnóstico en una bacteria atenuada asociada a células de organismos superiores.

25 La expresión de genes heterólogos en microorganismos que están asociados a células de organismos superiores, permite controlar la producción *in situ* de biomoléculas para investigación así como controlar la liberación de 30 biofármacos, como por ejemplo controlar la expresión de antígenos o proteínas antitumorales, gracias al tropismo de algunas bacterias por ciertos tejidos u órganos, lo cual puede ser usado para incrementar la concentración local de las proteínas recombinantes. De modo que, de acuerdo con 35 una realización preferida de la presente invención, se proporciona un método de control de la expresión de antígenos heterológos en una bacteria atenuada asociada con

células de organismos superiores para su uso como vacuna recombinante.

Bajo ciertas condiciones, es posible emplear bacterias 5 que presentan tropismo por células tumorales (Pawelek et al., Cancer Res. 1997, 57: 4537-44; Low et al., Nat. Biotechnol. 1999, 17: 37-41; Neumunaitis et al., Carcer Gene Ther. 2003, 10: 737-44) para programar la liberación de proteínas que inhiben el crecimiento de células 10 tumorales, donde aquellas proteínas pueden ser producidas bajo el control del inductor químico que puede ser administrado en intervalos regulares para optimizar la concentración local del producto recombinante.

15 Según otro modo de realización preferido de la presente invención, se proporciona un método de control de la expresión de proteínas antitumorales heterólogas en una bacteria atenuada asociada con células de organismos superiores, que presente cierta afinidad por células 20 tumorales de dicho organismo superior.

Según otro modo aún más preferido, la proteína 25 antitumoral heteróloga consiste en una interleuquina, una citoquina, una toxina, una proteína citotóxica o una proteína antiangiogénesis.

La capacidad de salicilato y derivados de atravesar a través de las membranas biológicas permite que el sistema de expresión de proteínas heterólogas sea inducido por este 30 en el sitio de acción, que en la práctica es el lugar de interacción entre la bacteria y la célula del organismo superior hospedante.

En el sentido de la presente invención, se entiende 35 por asociación entre un microorganismo con un organismo superior a cualquier tipo de interacción del microorganismo con el organismo superior, incluyendo simbiosis o

patogénesis. De modo que el sistema de control de la expresión génica descrito en la presente invención, puede establecerse en microorganismos, preferentemente en bacterias procariotas, y más concretamente en bacterias 5 Gram-negativas atenuadas, las cuales pueden hospedarse o infectar células de organismos eucarióticos, incluyendo humanos.

En el sentido de la presente invención, se entiende 10 por derivados del salicilato a sustituciones simples de la molécula de salicilato, incluyendo al menos una modificación del esqueleto de salicilato. Se incluyen por ejemplo compuestos tales como el benzoato (sustitución de -OH por -H) o el ácido acetil salicílico (-O-COCH₃ en lugar 15 de -OH).

Vectores con sistemas reguladores que son fuertemente regulados por salicilato o derivados y que pueden ser integrados en el cromosoma bacteriano de modo estable han 20 sido previamente desarrollados (Cebolla et al., Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68: 5034-41).

La fuertemente regulada expresión de proteínas tóxicas heterólogas por el microorganismo huésped, puede ser 25 empleada para eliminar selectivamente los organismos recombinantes usados una vez que estos han realizado la función deseada, con el fin de alterar la flora indígena lo menos posible. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida, las células bacterianas pueden contener un gen 30 regulatorio sensible a salicilato o derivados y un promotor diana, el cual controla la expresión de un gen suicida codificando un producto tóxico para la célula hospedada, como por ejemplo una enzima de restricción, una toxina, un péptido antibacteriano, etc. En este grupo de genes 35 suicidas se incluyen por ejemplo el sistema kis/kid (de la Cueva-Mendez y cols. EMBO J. 2003, 22:246-251), colE3 (Diaz y cols. Mol Microbiol. 1994, 13:855-861), etc.

El método de control de la expresión de genes heterólogos en microorganismos que están asociados a células de organismos superiores de acuerdo con la presente invención, puede ser empleado para el estudio de los genes involucrados en la patogénesis usando bacterias con fenotipos condicionales. La acción del gen se puede encender o apagar en distintos estadios del proceso biológico. Las necesidades de un gen en particular para un determinado proceso se puede ensayar controlando la presencia del inductor en un determinado estadio del proceso de asociación.

En otra realización preferida de la presente invención, la población de un microorganismo dado en biorreactores, tales como los fermentadores, pueden ser selectivamente eliminados al añadir ácido acetil salicílico o una molécula equivalente. Este sistema puede de igual forma ser usado en terapia génica con el fin de matar selectivamente células que pudieran ser selectivamente infectadas con una bacteria o virus que produzca un producto tóxico o una biomolécula capaz de disparar la apoptosis o cualquier otro mecanismo de muerte celular, en las células malignas.

25

De acuerdo con la presente invención, el uso de sistemas de expresión inducibles por derivados del salicilato para matar selectivamente organismos recombinantes una vez han realizado la función deseada, forma parte del ámbito de protección de la misma. En un ambiente deseado, la muerte selectiva de los microorganismos manipulados genéticamente sería desencadenada en el ambiente con el fin de que la flora indígena fuera alterada lo menos posible. Para lograr esto, las células contendrían un sistema regulador de respuesta a derivados del salicilato y un promotor diana, el cual controla la expresión de un gen suicida codificando para

una proteína tóxica (por ejemplo una enzima de restricción, una toxina, péptido antibacteriano, etc.). Las células y bacterias y los sistemas reguladores son bien el sistema regulador *nahR/Psal*, bien la cascada *nahR/Psal-xylS2/Pm*. Se dispone de un gen codificante para una toxina, por ejemplo la bacteriocina *cole3*, una enzima de restricción como *EcoRI*, aguas abajo de los promotores *Psal*, *Pnah* o *Pm*. Las construcciones genéticas son introducidas e insertadas en el cromosoma por recombinación (Datsenko KA y Wanner BL, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97:6640-5) o por transposición usando un transposición mini *Tn5* (Herrero M y cols., J Bacteriol. 1990, 172:6557-67). Se usan marcadores antibióticos que son escindibles (Datsenko KA y Wanner BL, Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97:6640-5) para seleccionar la inserción en el cromosoma del sistema de suicidio controlable por derivados salicílicos, pero dejar luego la cepa susceptible del uso del mismo marcador de resistencia a kanamicina, pero además haciéndolo más aceptable para su liberación al medio ambiente. De modo que puede ser usado para controlar la muerte de vacunas vivas una vez el tiempo requerido para su acción es suficiente.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de una bacteria diseñada que contiene el sistema regulador seleccionado del grupo consistente en al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia de LysR/NahR de reguladores, al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia del ArAC/XylS de reguladores, al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia de reguladores de MarR, al menos un sistema regulador *nahR/Psal* o mutantes de los mismos elementos, al menos un sistema de expresión de *xylS/Pm* o mutantes de los mismos elementos, un circuito genético en cascada que comprende el regulador transcripcional NahR o una forma mutante y el regulador del transcripcional XylS o una forma del mutante, o una combinación de estos, en el método de control de la expresión de genes heterólogos en

dicha bacteria que se asocia a células de organismos superiores. De modo preferente, dichos genes heterólogos codifican para una proteína terapéutica o de diagnóstico. En una realización preferida, dicha proteína terapéutica es 5 un antígeno, una proteína antitumoral o mezcla de estos.

Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida de la presente invención, ésta proporciona el uso de una sistema regulador de la expresión de genes heterólogos en 10 bacterias asociadas a células tumorales de un organismo superior, donde dicho sistema regulador es controlado por salicilato o derivados.

De igual forma, la presente invención va dirigida 15 también, al uso del sistema regulador de la expresión de genes heterólogos en bacterias asociadas a células de organismos superiores, para el control de la expresión de un antígeno heterólogo como vacuna viva recombinante.

20 BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1:

A) Curva dosis-respuesta de SL7207 4S2 portando distintas construcciones con $Pm::trp'::'lacZ$. Las inducciones se realizaron en medio Luria Bertani a 30°C. Tras 4 horas en presencia de distintas concentraciones de salicilato se determinó la actividad enzimática en unidades Miller (cuadrados para pWSK-trp'::'lacZ y triangulos para pCAS-trp'::'lacZ. Los mismos resultados se obtuvieron tras 30 6 horas de inducción.

B) Comparación en detalle entre los rangos de inducción obtenidos tras inducir SL7207 4S2 con salicilato 2 mM durante 4 horas (n=3, las barras de error representan la desviación estándar). Aunque la producción total de 35 β -galactosidasa que se obtiene con pCAS-trp'::'lacZ es mayor, los bajos niveles basales de pWSK-trp'::'lacZ le confieren un rango de inducción 10 veces mayor.

Figura 2:

SL7207 4S2 infectando células HeLa expresando β -galactosidasa tras la inducción con salicilato o ácido acetil salicílico (2mM). En A) podemos observar los altos niveles basales que presenta SL7207 4S2 pCAS-trp $^{\prime}:::\prime$ lacZ mientras que en D) los niveles basales de pWSK-trp $^{\prime}:::\prime$ lacZ son indetectables. Sin embargo, se aprecian grandes diferencias en los niveles inducidos entre ambos vectores, -de alto y bajo número de copias- B, E). Además, el AAS y el salicilato inducen niveles comparables de β -galactosidasa C, F).

Figura 3:

15 Análisis por FACS de las células F1.A11 infectadas con SL7207 4S2 pWSK (A) o pWSK-GFP (B y C). Tras la infección, los, cultivos celulares se indujeron con salicilato 2 mM en el medio de cultivo durante 4 horas (A y C). Los diagramas representan el número de células seleccionadas frente a la 20 fluorescencia obtenida por la GFP (FL1).

Figura 4:

25 Análisis por FACS de una suspensión celular del bazo obtenida de un ratón infectado con SL7207 4S2 pWSK (A) e inducido intraperitonealmente con 2 mg de salicilato, pWSK-GFP no inducido (B) o inducido (C). Los diagramas representan el número de células seleccionadas frente a la 30 fluorescencia obtenida por la GFP (FL1).

Figura 5:

35 Análisis por citometría de flujo de una suspensión celular obtenida de los nódulos mesentéricos de ratones previamente infectados con SL7207 4S2 pWSK (A), e inducidos intraperitonealmente con 2 mg de salicilato, pWSK-GFP pero no-inducido (B) o inducido (C).

Figura 6:

Incorporación de timidita tritiada por parte de células T CD4+ obtenidas del bazo de ratones infectados oralmente con 5x10E8 SL7207 4S2 pWSK e inducidos (grupo 3), pWSK-trp'::'lacZ pero no-inducido (grupo 2) o pWSK-trp'::'lacZ e inducido (grupo 1).

Figura 7:

Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de fibrosarcomas producidos subcutáneamente. Los 10 ratones que desarrollaron los tumores fueron infectados con SL2707 4S2 con pWSK-GFP y fueron no-inducidos (curva en gris) o inducidos intraperitonealmente con 2 mg de salicilato (curva en blanco).

15 EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Control mediante salicilato y ácido acetil salicílico de la superproducción de genes heterólogos en *Salmonella*.

20 En éste ejemplo se usó la estirpe atenuada de *Salmonella typhimurium* SL7207, previamente usada como portadora de vacunas en distintos experimentos (Darji A y cols., Cell. 1997, 91:765-75; Paglia P y cols., Blood. 25 1998, 92:3172-6; y Medina E y cols., Eur J Immunol. 1999, 29:693-9). Se manipuló genéticamente la estirpe para insertar en su cromosoma el módulo regulador del circuito de amplificación en cascada descrito anteriormente en la presente memoria. Éste trabajo muestra un método por el 30 cual se regula la sobreexpresión heteróloga de genes con ácido acetil salicílico y salicilato como inductores en una bacteria capaz de infectar células de mamífero.

Para probar el potencial de amplificación sobre la 35 expresión génica proporcionada por el circuito en cascada dependiente de derivados salicílicos, el regulador *nahR/Psal::xylS2* se insertó en el cromosoma de SL7207 tal y

como se describe a continuación. Se uso un mutante espontáneo de SL7207 resistente a rifampicina, como receptor de la conjugación con S17-1 λ pir pCNB4S2. La conjugación se realizó en LB, citrato sódico 1% durante 3 horas a 30°C. Los eventos de transposición se aislaron incubándolos una noche en medio LB con rifampicina 20 μ g/mL, kanamicina 50 μ g/mL. Se tomaron las colonias sensibles a ampicilina (100 μ g/mL). La cepa resultante, SL7207 4S2 fue electroporada con pCAS-trp $^{\prime}:::\mathbf{lacZ}$ o pWSK-trp $^{\prime}:::\mathbf{lacZ}$. Éstos plásmidos contienen la fusión trp $^{\prime}:::\mathbf{lacZ}$ promotor *Pm* en un vector de alto y bajo número de copias respectivamente. Se crecieron cultivos a 37°C y 150 rpm en LB ampicilina hasta llegar a una D0660 de aproximadamente 0.3. Entonces se les añadió la cantidad correspondiente de inductor y se volvieron a incubar a 37°C hasta que se tomaron las mediadas de unidades Miller. Como se observa en la figura 1^a, tanto el salicilato como el ácido acetil salicílico inducen en igual medida el sistema independientemente del plásmido que se use. Los resultados obtenidos en dos puntos (4 y 6 horas reinducción) fueron idénticos, mostrando que el sistema estaba totalmente inducido tras las 4 horas.

Al reducir el número de copias del plásmido marcador (Fig 1b), se obtuvieron niveles basales 10 veces menores (4.384 + 388 vs 204 + 6 Unidades Miller, n=3) mientras que la capacidad de inducción se mantuvo en su mayor parte. Una vez inducido (2 mM salicilato), el efecto de amplificación sinérgica del sistema de expresión permite al vector basado en pWSK alcanzar actividades enzimáticas comparables al vector pCAS (36.792 + 798 vs 66.185 + 8.171 respectivamente. El rango de inducción de pWSK mostró ser 10 veces mayor que el basado en pCAS (180 frente a 15). Éstos resultados hicieron preferible usar SL7207 pWSK-trp $^{\prime}:::\mathbf{lacZ}$ para los siguientes experimentos. Dado que además se pudo apreciar inhibición del crecimiento con concentraciones altas (5 mM) de ácido acetil salicílico,

decidimos usar 2 mM para entrar en detalle en experimentos in vitro con cultivos celulares.

Las dosis terapéuticas de salicilato medidas en plasma 5 llegan a ser de 4,6 mM. Dado que podemos alcanzar niveles de expresión comparables con 2 mM y 5 mM, decidimos usar la dosis más alta para experimentos in vivo, dado que la vida media descrita es de 2-4 horas. Así, dando una dosis única de 5 mM obtendríamos al menos 4 horas de activación.

10

Ejemplo 2. Uso de circuitos de respuesta a derivados del salicilato para inducir la expresión génica en células infectadas.

15

Este ejemplo muestra cómo la expresión de la β -galactosidasa puede ser controlada en células bacterianas que estén infectando células de mamífero, todo esto añadiendo derivados del salicilato. Se usaron SL4S2 portando pWSK- trp^r::^rlacZ y pCAS- trp^r::^rlacZ para 20 infectar células de mamífero (Royo JL y cols., sometido) tal y como redescribe en las siguientes líneas. Tanto células HeLa como los macrófagos J774.A1 se cultivaron en placas de 24 pocillos con medio DMEM, con L-glutamina y suero fetal caprino al 10%. Los cultivos celulares se 25 incubaron a 37°C, 6% CO₂ hasta una confluencia de casi el 80%. Los cultivos de *Salmonella* se crecieron una noche a 37°C, 15m rpm en LB 0.3 M cloruro sódico, y ampicilina 100 μ g/mL cuando fue necesario. Cada pocillo se infectó con 10E6 bacterias, provenientes de un cultivo saturado y 30 fueron incubados a 37 °C y 6 % CO₂ 1 hora (J774A.1) o 2 horas (HeLa). Las células se lavaron 3 veces con PBS antes de añadir nuevo DMEM suplementado con gentamicina 50 μ g/mL para matar las bacterias que quedaran en el exterior y ampicilina para evitar la pérdida del plásmido. Cuando se 35 requiso, se añadió también salicilato o ácido acetil salicílico a una dosis final de 2 mM. Tras 4 horas de incubación (37 °C, 6% CO₂), los cultivos celulares se

lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldéhido al 2% durante 20 minutos y se tiñeron con el kit de tinción de β -gal (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión de la β -galactosidasa confirmó que tanto el salicilato como el ácido acetil salicílico alcanzan el citoplasma bacteriano. Una vez dentro de la célula, ambos inductores activan la cascada de señales a niveles comparables (Figura 2b, 2c, 2d y 2f). Los niveles basales de pCAS- trp $^{\prime}::\text{lacZ}$ se detectaron fácilmente. Sin embargo, la actividad basal de lacZ producida desde el vector de bajo número de copia resultó ser indetectable (Figura 2 a y 2d). Éstos experimentos mostraron que ambas moléculas pueden difundir y llegar al citoplasma bacteriano activando así el sistema de expresión. Además, el ambiente eucariótico no interfiere significativamente con la sobreexpresión génica, probablemente debido a que los componentes del sistema en cascada es activo en un amplio rango de condiciones metabólicas. Aunque los mismos resultados se observaron con macrófagos J774A.1, se observó algo de muerte celular causada por la propia infección.

EJEMPLO 3. Uso de circuitos de respuesta a derivados salicílicos para controlar la expresión en células tumorales.

En este ejemplo se confirma la capacidad de control de la expresión génica por salicilato y el sistema de expresión en cascada usando la proteína verde fluorescente como gen marcador. Para evitar una potencial barrera metabólica, se usó SL7207 4S2 con pWSK-GFP para monitorizar la expresión de la GFO in vitro. Se pudo realizar también un experimento para caracterizar la expresión génica de SL7207 4S2 en nuestra línea tumoral usada como modelo. F1.A11 es una línea celular altamente tumorigénica y metastásica derivada de un fibrosarcoma murino de la estirpe Balb/c. Las metástasis son fáciles de localizar puesto que F1.A11 expresa y presenta la β -galactosidasa

como marcador tumoral (Paglia P y cols., Blood. 1998, 92:3172-6 y referencias interiores). Se infectaron con cultivos casi confluentes de F1.A11.con SL7207 4S2 con pWSK-GFP o su correspondiente vector vacío. La inducción se realizó tal y como redescribe a continuación. Tras una inducción de 4 horas con 2 mM de salicilato las células se recogieron, se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. En la figura 3 se representan eventos celulares contados frente a la fluorescencia relativa (FL1) de células infectadas en distintas condiciones. La fluorescencia varió entre 11,72 (vector vacío) y 12,51 (infectadas con SL7207 pWSK-GFP). Cuando los cultivos fueron observados al microscopio, no se observó GFP ni en el vector vacío ni en el pWSK-GFP no inducido. Tras la adición de salicilato a 2 mM (Figura 3c), la fluorescencia alcanzó 116,7 (10 veces superior). Tomando los datos en conjunto, se consideró que SL7207 4S2 era un buen candidato para estudios más profundos.

Ejemplo 4. Control in vivo de la expresión génica en animales infectados.

En éste ejemplo, se usaron los circuitos de respuesta a salicilato para controlar la expresión génica de microbios infectando animales vivos. Se administró intraperitonealmente (ip) 10E6 unidades formadoras de colonias (en 150 µl de PBS) de la *Salmonella* atenuada y portando el módulo del circuito en cascada (SL707 4S2 con pWSK-GFP). 30 minutos tras la infección, se le inyectaron 2 mg de salicilato bien por vía intravenosa (iv), bien ip de forma que se alcanzaba 5 mM de salicilato. Tras 4 horas de incubación, se sacrificaron los animales y se analizaron los exudados peritoneales, bazo y nódulos linfáticos mesentéricos. Se encontraron células altamente positivas para GFP en nódulo mesentéricos (Figura 5) y bazo (Fig 4), cuando se comparó con los no inducidos, o inducidos pero con el vector vacío. No se vieron células positivas para

GFP en los exudados peritoneales, revelando bien una migración, bien la apoptosis de los macrófagos peritoneales. Los resultados obtenidos fueron idénticos tanto si la inducción fue ip como iv.

5

EJEMPLO 5. Control in vivo de la expresión de antígenos en animales infectados.

En éste ejemplo, se usó una cepa bacteriana atenuada como vector para presentar antígenos heterólogos al sistema inmune de ratón, de una forma condicional a la administración de ácido acetil salicílico. Se puede desencadenar una respuesta inmune de protección mediante el uso de distintas estirpes atenuadas derivados de estirpes silvestres patógenas tales como *Salmonella enterica* serovar *Typha* y *typhimurium* (*S. Typha* y *S. typhimurium*). En éstos experimentos, se inmunizó a los ratones con 5x10E8 SL7207 4S2 portando el plásmido pWSK o el pWSK-trp¹::¹lacZ. 12 horas tras la inmunización, se administraron ip 2 mg de salicilato. Se les dio iguales dosis de salicilato los días 7 y 14 posteriores al desafío. Dos semanas tras la ultima inducción, se sacrificaron los animales. Se realizaron ensayos de proliferación con las células de bazo. En la figura 6 se muestra que la reestipulación in vitro de las células CD4+ T tras la adición de β-galactosidasa pura resultó ser significativamente distinta entre los ratones inducidos y los no inducidos. Éste experimento confirmó que SL7207 4S2 activó los módulos *nahR/Psal* y *xylS2/Pm* promoviendo así la expresión de la β-galactosidasa. Ésta señal podría por lo tanto modular la respuesta inmune en ratones de una manera condicional.

Ejemplo 6. Expresión intratumoral de proteínas recombinantes de forma regulada.

35

En éste ejemplo, se midió cómo el tropismo de ciertos microbios hacia los tumores u otro tipo de tejido enfermo

puede ser usado para la liberación de forma controlada de la expresión proteica. Este ejemplo, muestra la posibilidad de concentrar la expresión proteica en células donde las proteínas terapéuticas se pudieran producir tras la 5 administración de ácido acetil salicílico. Los tumores se generaron mediante una inyección subcutánea de 10E4 células F1.A11, en el flanco inferior izquierdo de ratones hembras de la estirpe Balb/c con 9 semanas de edad. Cuando los tumores fueron palpables (100-200 mg), se administraron 10 intrapareneteral de 10E6 unidades formadoras de colonia de SL7207 4S2 con pWSK-GFP y su correspondiente vector vacío. En día +4 , los ratones se dividieron en distintos grupos. Algunos fueron tratados con una dosis de 5 mM de salicilato 15 iv/ip, y otros se mantuvieron como controles sin inducir. Cuatro horas tras la inducción se sacrificaron los animales y se separaron asépticamente tanto bazo, ganglios mesentéricos como los propios tumores para realizar los análisis. Las suspensiones celulares de tumores independientes que habían sido tratados con salicilato, 20 mostraron un fenotipo positivo en FL1 (Fig 7). Las células en una ventana de FL1 > 10E2 pasaron de 11 a 39-48%, mostrando un comportamiento paralelo a como ocurrían las infecciones in vitro. Otros tumores se fijaron y tifieron para ver la presencia de SL7207 4S2. Los órganos se 25 pesaron, homogeneizaron y resuspendieron en PBS estéril antes de sembrarse. En algunos ensayos, las relaciones variaban entre 4:1 a 850:1, de acuerdo con lo descrito previamente como tropismo positivo (Pawelek JM y cols., Cancer Res. 1997 Oct; 57:4537-44; Low KB y cols., Nat 30 Biotechnol. 1999, 17:37-41; y Neumunaitis J y cols., Cancer Gene Ther. 2003; 10:737-44). Por otro lado, y sin contar la alta expresión de GFP localizada en el tumor, no se observó tropismo en varios ratones. Esta observación fue descrita previamente y puede ser debida a la distinta naturaleza de 35 las líneas tumorigénicas, el fondo genético de los ratones, la estirpe de *Salmonella* usada o simplemente a variaciones estocásticas atribuidas a fenómeno de progresión tumoral.

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos que están asociados a células de organismos superiores caracterizado porque comprende:

- a. un sistema regulador que puede ser controlado por un efector químico;
- b. un microorganismo huésped que contiene el sistema regulador capaz de interaccionar o asociarse con células de organismos superiores;
- c. un compuesto químico efector que es salicilato o un derivado de salicilato y que puede transportarse a través del organismo superior asociado y activar o reprimir la expresión del microorganismo huésped modificado

2. El método según la reivindicación 1 caracterizado porque al menos una de las proteínas reguladoras es controlada por salicilato, antranilato, 2-acetil salicilato, 4-cloro-salicilato, 5-cloro-salicilato, 3,5-dicloro-salicilato, 5-metoxi-salicilato, benzoato, 3-metil-benzoato, 2-metoxi-benzoato, 3-metil-salicilato, 4-metil-salicilato, o 5- metil - salicilato, cualquier otro derivado del salicilato que mantenga el grupo C-1 carboxílico en el anillo aromático o mezcla de estos.

3. El método según la reivindicación 2 caracterizado porque el sistema regulador comprende al menos una proteína reguladora que pertenece a la familia LysR/NahR de reguladores.

4. El método según la reivindicación 2 caracterizado porque el sistema regulador comprende al menos un derivado de la familia de reguladores XylS/AraC.

5. El método según la reivindicación 2 caracterizado porque el sistema regulador comprende una proteína reguladora que pertenece a la familia del MarR de reguladores.

5

6. El método según la reivindicación 2 caracterizado porque el sistema regulador consta de un sistema de expresión de *nahR/Psal* o mutantes de estos mismos elementos.

10

7. El método según la reivindicación 2 caracterizado porque el sistema regulador comprende un sistema de expresión de *xylS/Pm* o mutantes de los mismos elementos capaz de responder a cualquiera de los compuestos químicos de reivindicación 2.

15

8. El método según la reivindicación 2 caracterizado porque el sistema regulador comprende un circuito genético en cascada caracterizado porque comprende:

20

a. el regulador transcripcional NahR o una forma mutante de este y el regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este;

25

donde los reguladores transcripcionales están puestos en un orden jerárquico tal que el regulador transcripcional NahR o una forma mutante de este estimule la expresión del regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este y;

30

donde el regulador transcripcional NahR o una forma mutante de este y el regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este responden al mismo inductor;

35

b. un promotor diana terminal;

5 donde dicho promotor diana terminal está caracterizado porque es sensible de una forma dosis-dependiente al regulador transcripcional XylS o una forma mutante de este.

10 9. Un método según la reivindicación 1 caracterizado porque la célula capaz asociarse con organismos superiores y que contiene el sistema regulador de la expresión de genes heterólogos es una célula procariótica.

15 10. Un método según la reivindicación 9 caracterizado porque la célula procariótica es una célula bacteriana Gram-negativa.

20 11. Un método según la reivindicación 10 caracterizado porque la célula bacteriana Gram-negativa es una bacteria del genero *Salmonella*.

25 12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 9 a 11 desarrollado para controlar la expresión de proteínas terapéuticas o una proteína de diagnóstico en una bacteria atenuada asociada a células de organismos superiores.

30 13. Un método según la reivindicación 12 para controlar la expresión de un antígeno heterólogo en una bacteria atenuada asociada con células de organismos superiores, para su uso como una vacuna viva recombinante.

35 14. Un método según la reivindicación 12 para controlar la expresión de por lo menos una proteína antitumoral en una bacteria atenuada que se asocie con las células de organismos superiores, la cual presenta cierto tropismo por células tumorales de dicho organismo

superior.

15. El método según la reivindicación 14 caracterizado por que la proteína antitumoral se selecciona del grupo consistente en una interleuquina, una citoquina, una toxina, una proteína citotóxica o una proteína antiangiogénica.

10 16. El método según la reivindicación 9 caracterizado porque la bacteria además contiene un sistema regulador sensible a salicilato o derivados y un promotor diana, el cual controla la expresión de un gen suicida codificando un producto tóxico para la célula hospedada.

15 17. Uso del método de acuerdo con la reivindicación 9, para el estudio de los genes involucrados en la patogénesis usando bacterias con fenotipos condicionales.

20 18. Uso del método de acuerdo con la reivindicación anterior 16, para la eliminación selectiva de microorganismos en biorreactores.

25 19. Uso del método de acuerdo con la reivindicación anterior 16, para la eliminación selectiva de células que pudieran ser selectivamente infectadas con una bacteria o virus que produzca un producto tóxico o una biomolécula capaz de disparar la apoptosis o cualquier otro mecanismo de muerte celular en las células malignas.

30 35 20. Un método para controlar la expresión de proteínas terapéuticas heterólogas o proteínas de diagnóstico heterólogas en microorganismos que están asociados a células de organismos superiores caracterizado porque comprende:

5 a. disponer de una célula bacteriana que contiene un sistema regulador que puede ser controlado por salicilato o derivados como efector químico, la cual se asocia de modo específico a células de un organismo superior;

10 b. inducir la expresión de dichas proteínas terapéuticas heterólogas o proteínas de diagnóstico heterólogas mediante la administración de salicilato o derivados al organismo superior hospedante de la célula modificada.

15 21. Método de acuerdo con la reivindicación anterior 20, caracterizado porque el sistema regulador se selecciona entre el grupo formado por al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia del LysR/NahR de reguladores, al menos un derivado de la familia de reguladores XylS/AraC, al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia de reguladores de MarR, al menos un sistema regulador nahR/Psal o mutantes de los mismos elementos, al menos un sistema de expresión de *xylS/Pm* o mutantes de los mismos elementos, un circuito genético en cascada que comprende el regulador transcripcional NahR o una forma mutante y el regulador del transcripcional XylS o una forma del mutante, o una combinación de estos.

20 22. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 20 a 21, caracterizado porque dicha proteína terapéutica heteróloga es un antígeno heterólogo, una proteína antitumoral o mezcla de estos.

25 30 35 23. Uso de un sistema regulador de la expresión de genes heterólogos en bacterias asociadas a células tumorales de un organismo superior, el cual es controlado por

salicilato o derivados, para controlar la expresión de por lo menos una proteína antitumoral.

24. Uso de acuerdo con la reivindicación anterior 23, caracterizado porque la proteína antitumoral expresada se selecciona del grupo consistente en una interleuquina, una citoquina, una toxina, una proteína citotóxica o una proteína antiangiogénesis.

10 25. Uso de un sistema regulador de la expresión de genes heterólogos en bacterias asociadas a células de un organismo superior, el cual es controlado por salicilato o derivados, para controlar la expresión de un antígeno heterólogo, para su uso como una vacuna 15 viva recombinante.

20 26. Uso de un sistema regulador de la expresión de genes heterólogos en bacterias asociadas a células de un organismo superior, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores 23 a 25, caracterizado porque dicho sistema regulador se selecciona del grupo consistente en al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia de reguladores LysR/NahR, al menos un derivado de la familia de reguladores 25 XylS/AraC, al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia de reguladores MarR, al menos un sistema regulador *nahR/Psal* o mutantes de los mismos elementos, al menos un sistema regulador *xylS/Pm* o mutantes de los mismos elementos, una cascada circuito genético que comprende el regulador transcripcional NahR o una forma mutante y el regulador del transcripcional XylS o una forma del mutante, o una combinación de estos.

30 35 27. Uso de una bacteria modificada que contiene el sistema regulador seleccionado del grupo consistente en al menos una proteína reguladora que pertenezca a

la familia del LysR/NahR de reguladores, al menos un derivado de la familia de reguladores XylS/AraC, al menos una proteína reguladora que pertenezca a la familia de reguladores de MarR, al menos un sistema regulador nahR/Psal o mutantes de los mismos elementos, al menos un sistema de expresión de xylS/Pm o mutantes de los mismos elementos, una cascada circuito genético que comprende el regulador transcripcional NahR o una forma mutante y el regulador del transcripcional XylS o una forma del mutante, o una combinación de estos, en el método de control de la expresión de genes heterólogos en microorganismos que se asocian a las células de organismos superiores según reivindicación 1.

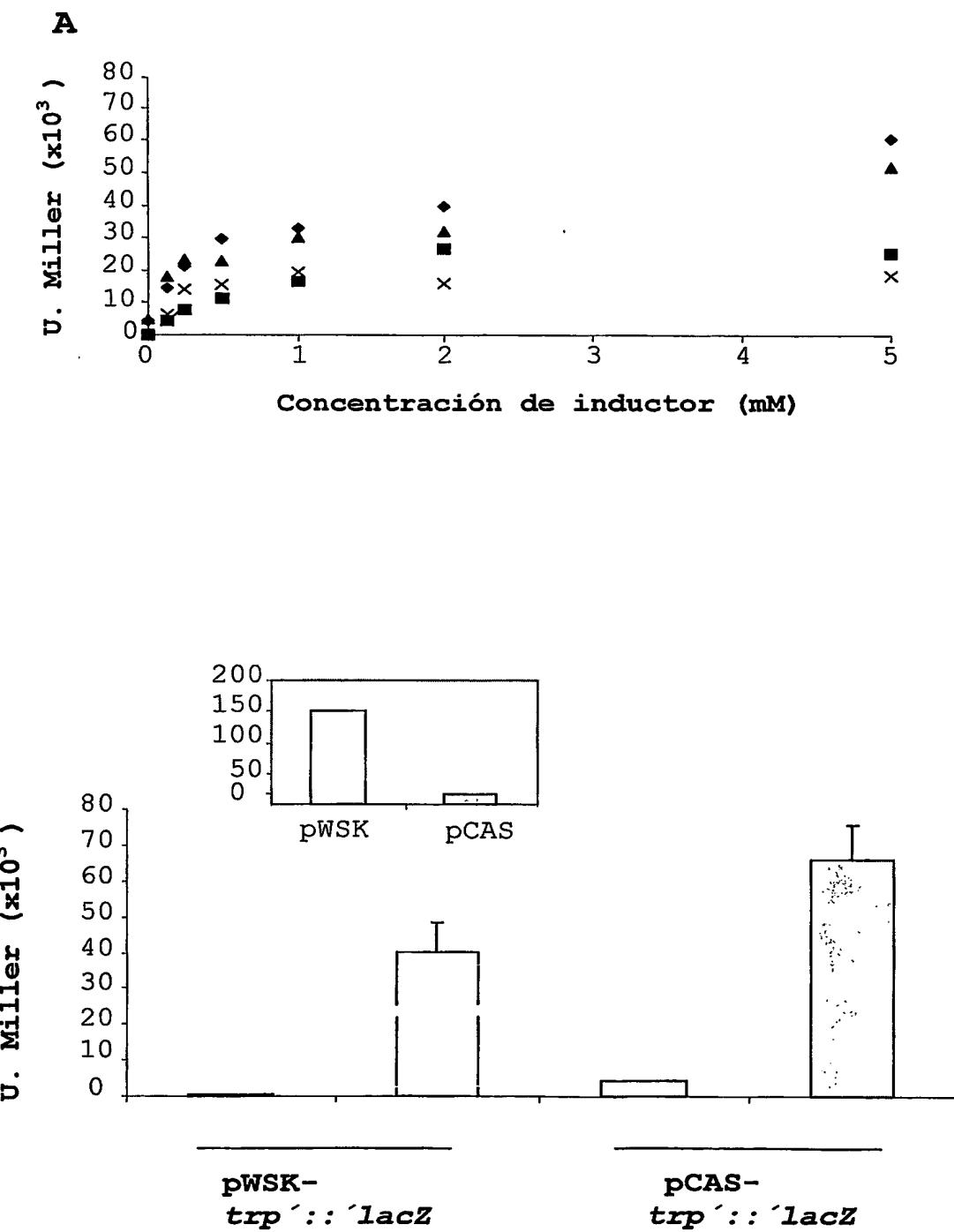
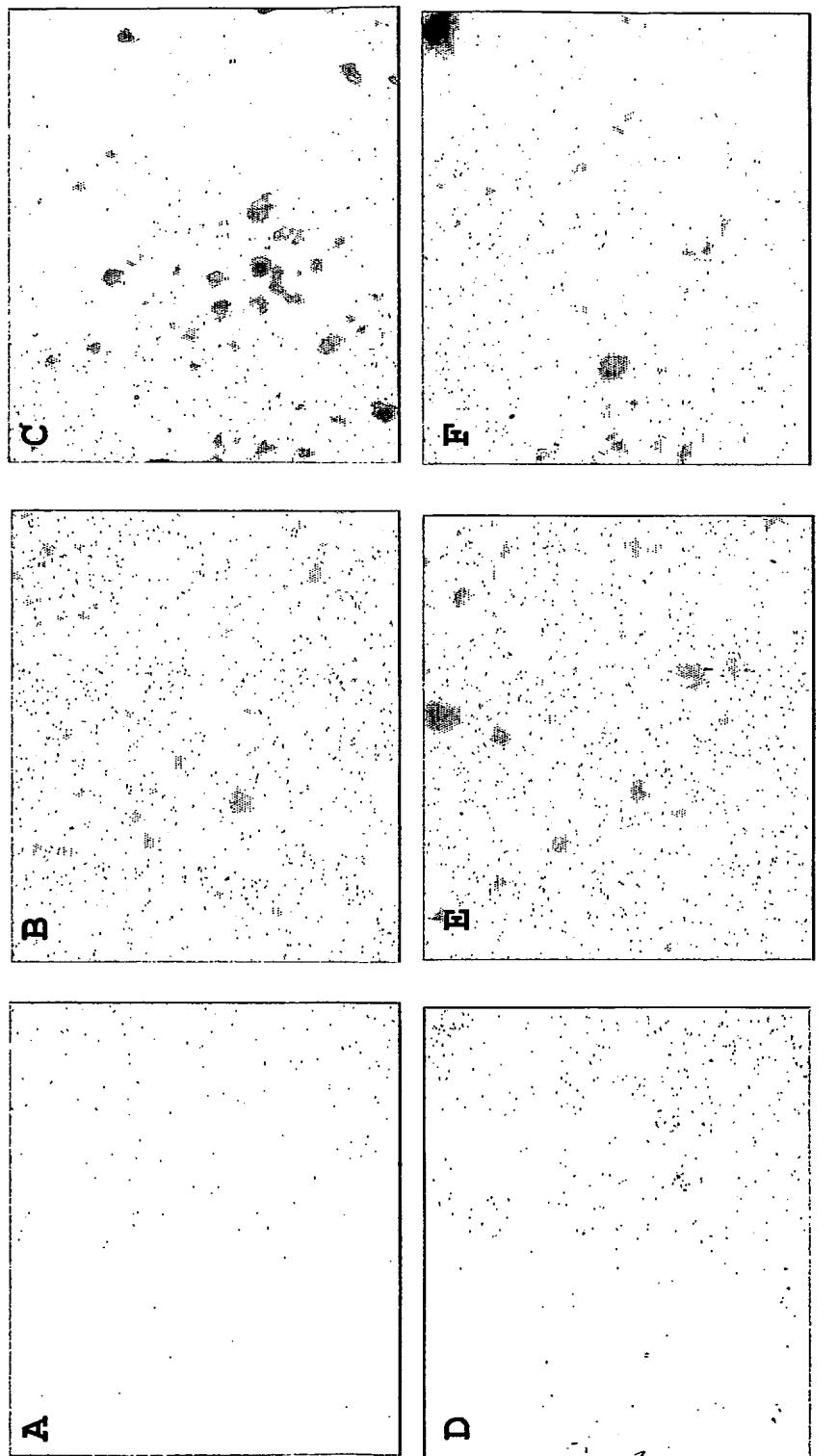
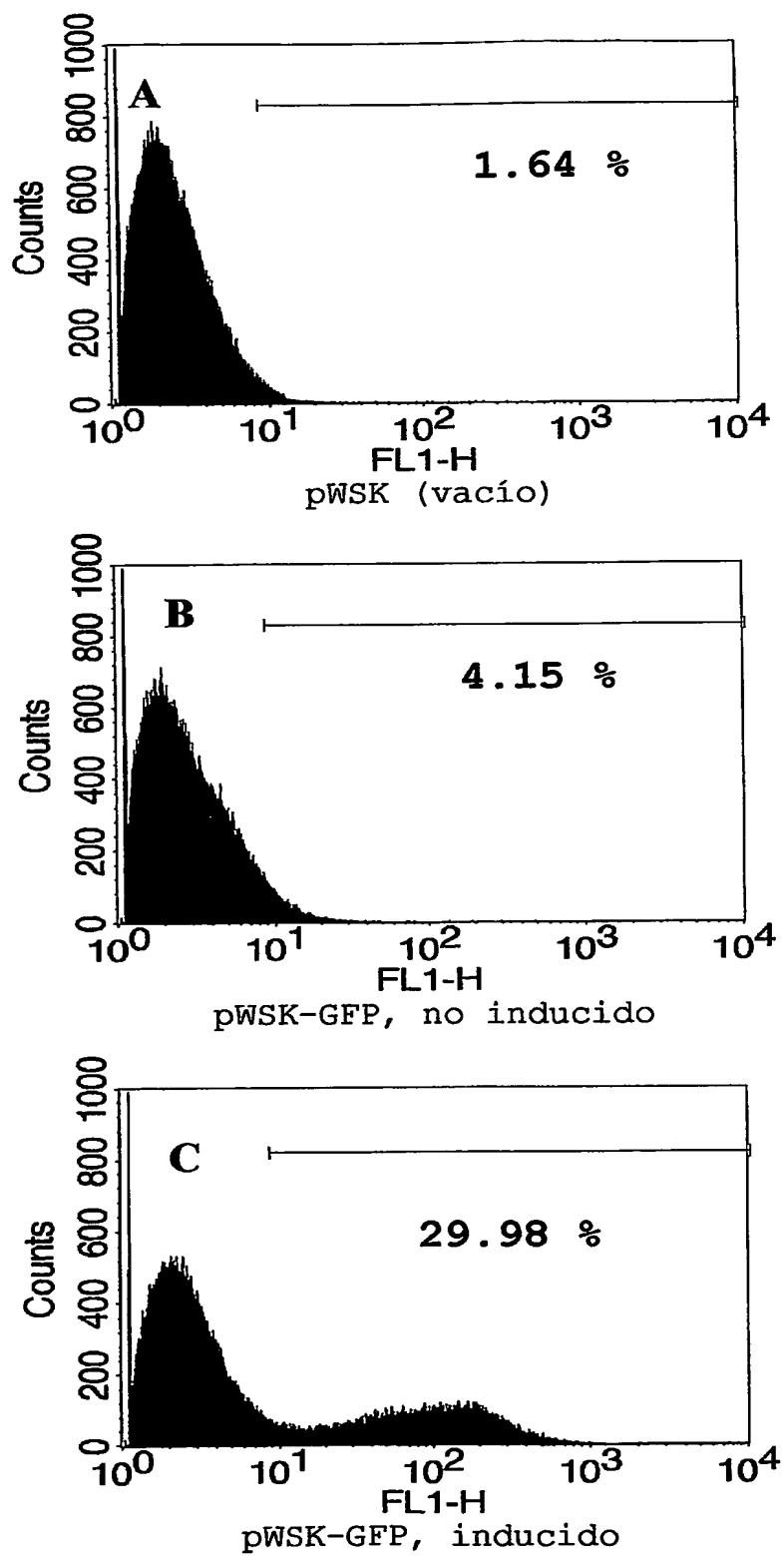
Figura 1

Figura 2



3/7

Figura 3

4/7

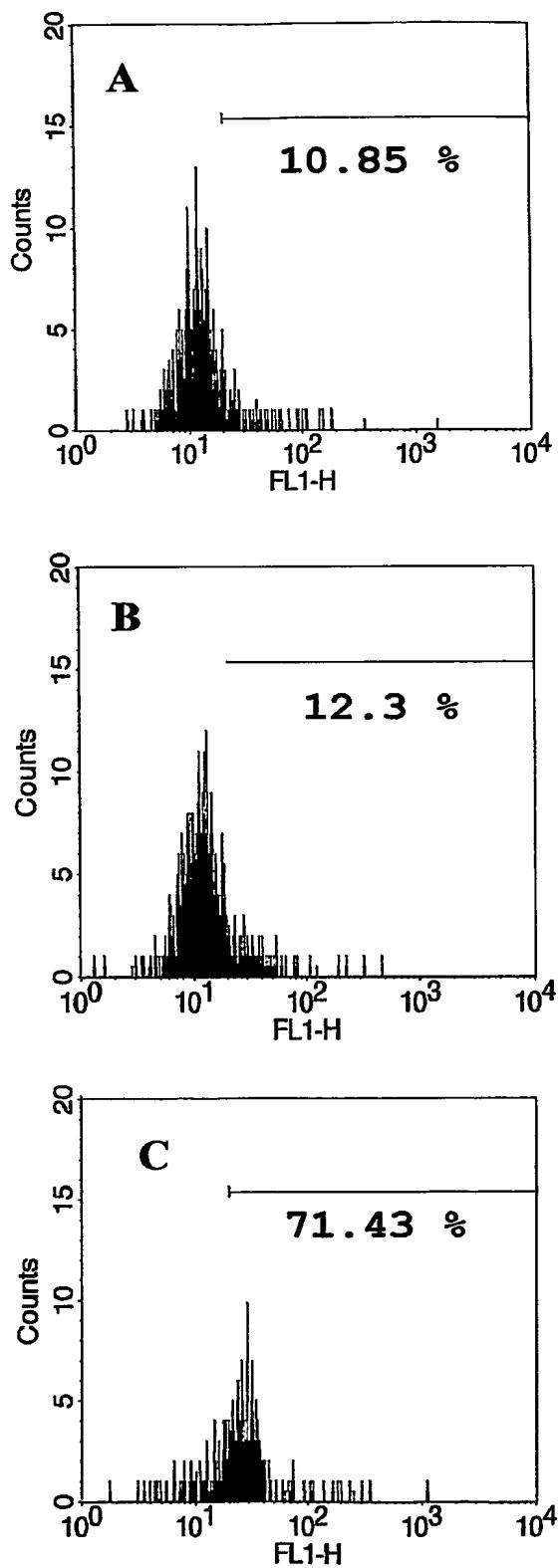
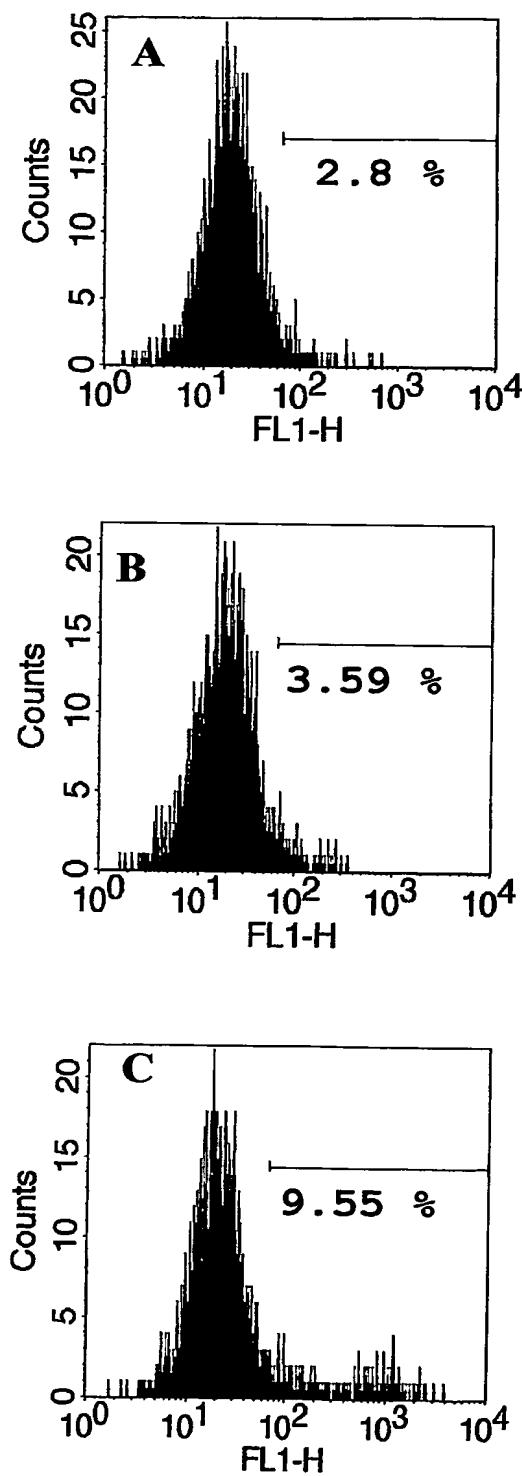
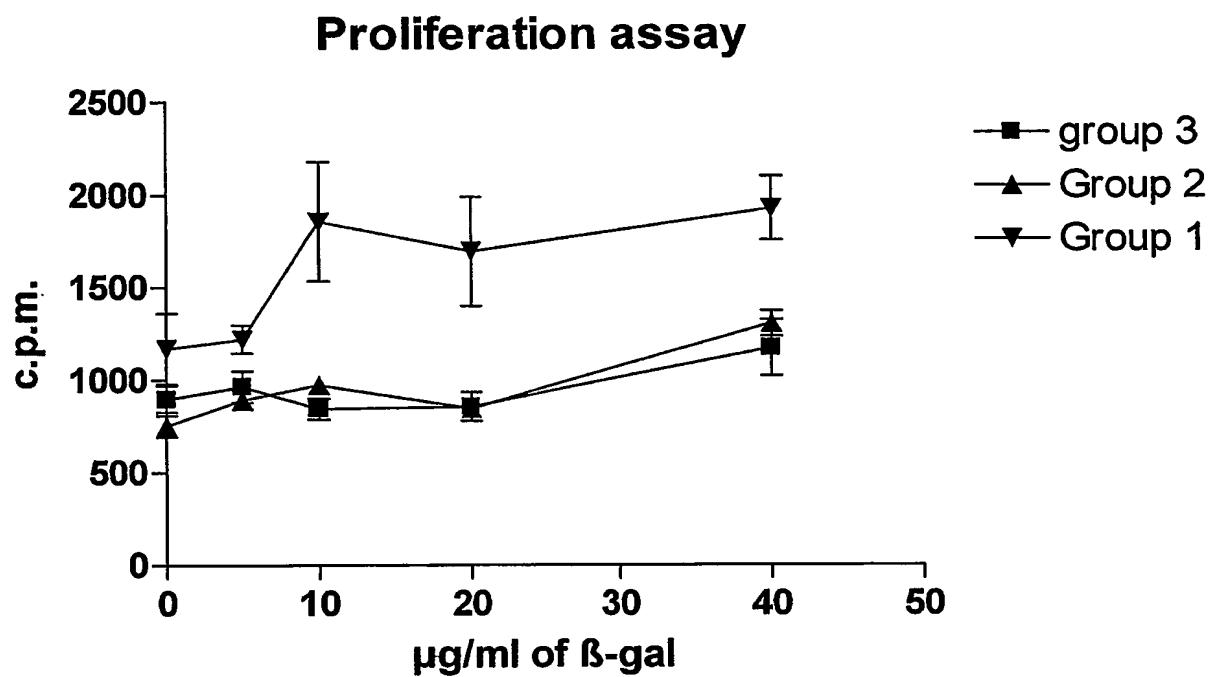
Figura 4

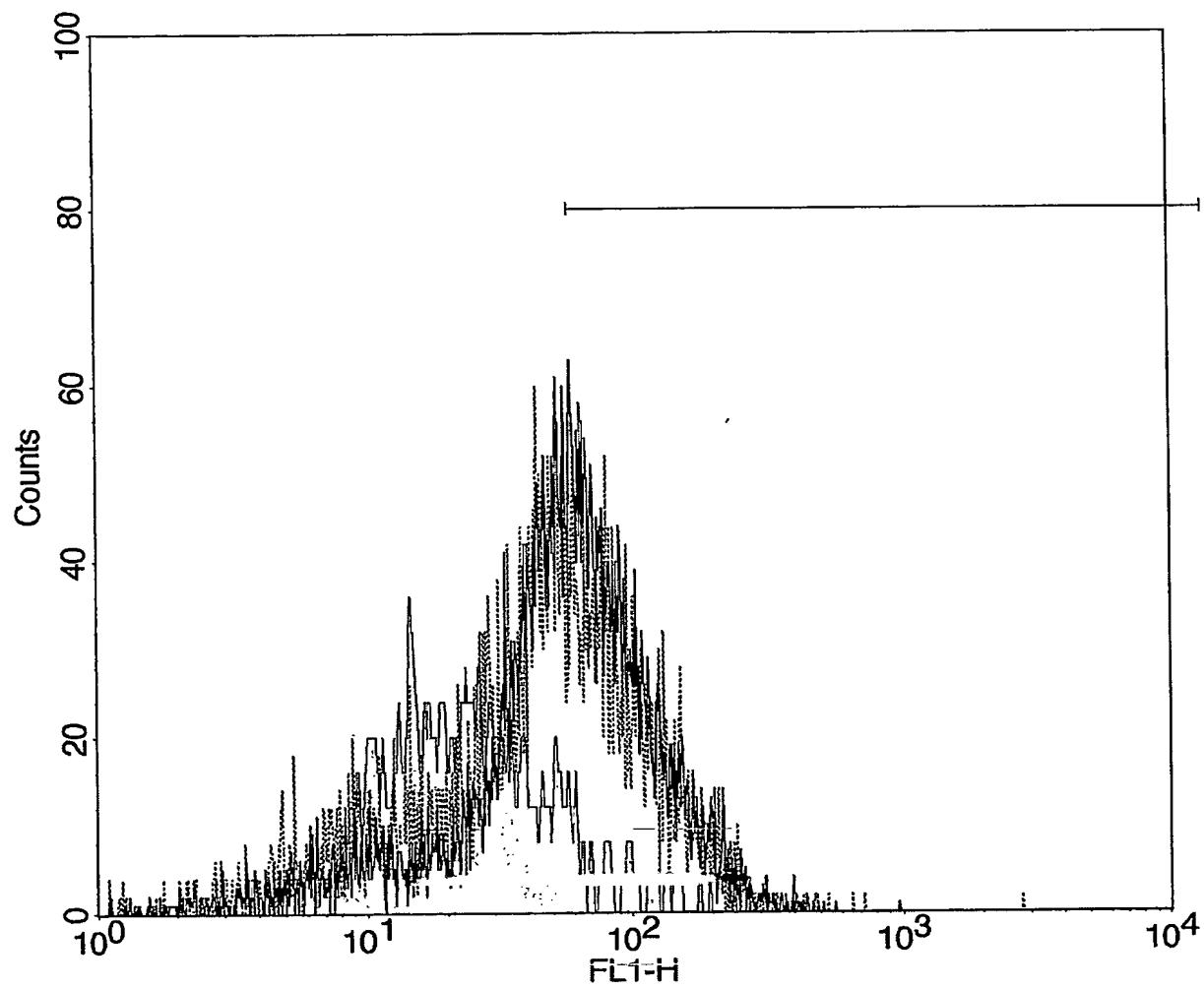
Figura 5

6/7

Figura 6



7/7

Figura 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C12N15/67, 1/21, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO03063593 A (VION PHARMACEUTICALS, INC.) 07.08.2003. See the whole document.	1, 2, 5, 9-20, 22-27
Y	SULAVIK, M.C. et al., "The <i>Salmonella typhimurium mar</i> locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence.", J. BACTERIOL., 1997, Vol.179, No. 6, pages 1857-1866. See the whole document.	1, 2, 5, 9-20, 22-27
A	US2003113293 A (BERMUDES et al.) 19.06.2003. See the whole document.	1-27
A	PAWELEK, J.M., et al., "Bacteria as tumour-targeting vectors.", LANCET ONCOL., 2003, Vol. 4, No. 9, pages 548-56. See the whole document.	1-27

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "B" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 2005 (17.03.2005)

Date of mailing of the international search report

31 March 2005 (31.03.2005)

Name and mailing address of the ISA/
SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000528

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CEBOLLA, A. et al., "Rational design of a bacterial transcriptional cascade for amplifying gene expression capacity.", NUCLEIC ACIDS RES., 2001, Vol. 29, No. 3, pages 759-766. See the whole document.	1-27
A	CEBOLLA, A. et al., "Improvement of recombinant protein yield by a combination of transcriptional amplification and stabilization of gene expression.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 2002, Vol. 68, No.10, pages 5034-5041. See the whole document.	1-27
A	US2001016354 A (CEBOLLA RAMIREZ et al.) 23.08.2003. Ver todo el	1-27
A	COHEN, S.P. et al., "Salicylate induction of antibiotic resistance in Escherichia coli: activation of the <i>mar</i> operon and a <i>mar</i> -independent pathway.", J. BACTERIOL., 1993, Vol.175, No.24, páginas 7856-7862. See the whole document.	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000528

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III

The International Searching Authority has found the following groups of inventions:

- 1) **Invention 1** (claims 1-3, 6 and 9-27), relating to a method for controlling the expression of heterologous genes in microorganisms associated with cells of higher organisms, based on a control protein belonging to the family LysR/Nahr, and the control system *nahR/Psa1*.
- 2) **Invention 2** (claims 1, 2, 4, 7 and 9-27), relating to a method for controlling the expression of heterologous genes in microorganisms associated with cells of higher organisms, based on a control protein belonging to the family XylS/AraC, and the control system *xylS/Pm*.
- 3) **Invention 3** (claims 1, 2, 5, 9-20 and 22-27), relating to a method for controlling the expression of heterologous genes in microorganisms associated with cells of higher organisms, based on a control protein belonging to the family MarR.
- 4) **Invention 4** (claims 1, 2 and 8-27), relating to a method for controlling the expression of heterologous genes in microorganisms associated with cells of higher organisms, based on the cascade control system *nahR/Psal::xylS/Pm*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2004/000528

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2003113293 A1	19-06-2003	WO0114579 A2 A3	01-03-2001
		CA2381755 A1	01-03-2001
		AU7572900 A	19-03-2001
		US2004219169 A1	04-11-2004
WO03063593 A1	08-07-2003	NONE	
US2001016354 A1	23-08-2001	WO0078976 A1	28-12-2000
		CA2375817 A1	28-12-2000
		AU5417200 A	09-01-2001
		EP1190076 A1B1	27-03-2002
		ES2167161 A1B1	01-05-2002
		ES2181534 A1B1	16-02-2003
		AT278786 T	15-10-2004
		DE60014640 D1	11-11-2004

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000528

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N15/67, 1/21, A61K48/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	WO03063593 A (VION PHARMACEUTICALS, INC.) 07.08.2003. Ver todo el documento.	1, 2, 5, 9-20, 22-27
Y	SULAVIK, M.C. et al., "The <i>Salmonella typhimurium</i> mar locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence.", J. BACTERIOL., 1997, Vol.179, No. 6, páginas 1857-1866. Ver todo el documento.	1, 2, 5, 9-20, 22-27
A	US2003113293 A (BERMUDES et al.) 19.06.2003. Ver todo el documento.	1-27
A	PAWELEK, J.M., et al., "Bacteria as tumour-targeting vectors.", LANCET ONCOL., 2003, Vol. 4, No. 9, págs 548-56. Ver todo el documento.	1-27

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la tecnología como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).		documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 17 Marzo 2005 (17.03.2005)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 31 MAR 2005 31.03.2005
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.	Funcionario autorizado J.L. Vizán Arroyo
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Nº de teléfono + 34 91 349 3449

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000528

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	CEBOLLA, A. et al., "Rational design of a bacterial transcriptional cascade for amplifying gene expression capacity.", NUCLEIC ACIDS RES., 2001, Vol. 29, No. 3, páginas 759-766. Ver todo el documento.	1-27
A	CEBOLLA, A. et al., "Improvement of recombinant protein yield by a combination of transcriptional amplification and stabilization of gene expression.", APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 2002, Vol. 68, No.10, páginas 5034-5041. Ver todo el documento.	1-27
A	US2001016354 A (CEBOLLA RAMIREZ et al.) 23.08.2003. Ver todo el documento.	1-27
A	COHEN, S.P. et al., "Salicylate induction of antibiotic resistance in Escherichia coli: activation of the <i>mar</i> operon and a <i>mar</i> -independent pathway.", J. BACTERIOL., 1993, Vol.175, No.24, páginas 7856-7862. Ver todo el documento.	1-27

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000528

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

VER HOJA ADICIONAL

1. Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:

4. Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nºs:

Indicación en cuanto a la protesta

Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.

El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

La administración de Búsqueda Internacional ha detectado los siguiente grupos de invenciones:

- 1) **Invención 1.** (reivindicaciones: 1-3, 6, 9-27) relativa a un método para controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos asociados a células de organismos superiores basado en una proteína reguladora perteneciente a la familia LysR / Nahr y en el sistema regulador *nahR* / *Psal*.
- 2) **Invención 2.** (reivindicaciones: 1, 2, 4, 7, 9-27) relativa a un método para controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos asociados a células de organismos superiores basado en una proteína reguladora perteneciente a la familia XylS / AraC y en el sistema regulador *xylS* / *Pm*.
- 3) **Invención 3.** (reivindicaciones: 1, 2, 5, 9-20, 22-27) relativa a un método para controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos asociados a células de organismos superiores basado en una proteína reguladora perteneciente a la familia MarR.
- 4) **Invención 4.** (reivindicaciones: 1, 2, 8-27) relativa a un método para controlar la expresión de genes heterólogos en microorganismos asociados a células de organismos superiores basado en el sistema regulador en cascada *nahR/Psal::xylS/Pm*.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembro de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2004/000528

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US2003113293 A1	19-06-2003	WO0114579 A2 A3 CA2381755 A1 AU7572900 A US2004219169 A1	01-03-2001 01-03-2001 19-03-2001 04-11-2004
WO03063593 A1	08-07-2003	NINGÚN DOCUMENTO	
US2001016354 A1	23-08-2001	WO0078976 A1 CA2375817 A1 AU5417200 A EP1190076 A1B1 ES2167161 A1B1 ES2181534 A1B1 AT278786 T DE60014640 D1	28-12-2000 28-12-2000 09-01-2001 27-03-2002 01-05-2002 16-02-2003 15-10-2004 11-11-2004